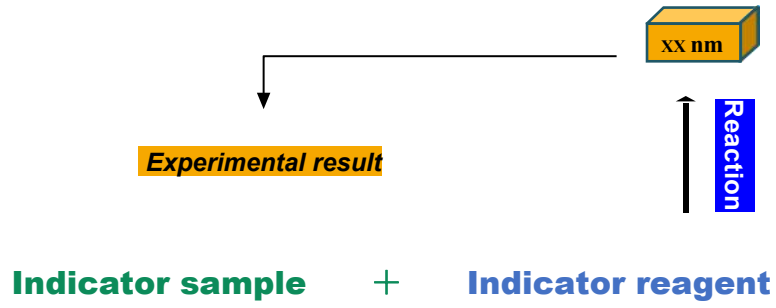
上海茁彩生物科技有限公司

Shanghai zcibio technology Co.,Ltd.



生化检测原理示意图

货号：ZC-S0322　　规格：100管/96样

NAD-苹果酸酶（NAD-ME）检测试剂盒说明书

微量法

正式测定前务必取2-3个预期差异较大的样本做预测定

产品内容：

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
提取液	液体 110mL×1 瓶	4℃保存	-
试剂一	液体 20mL×1 瓶	4℃保存	-
试剂二	粉剂×1 瓶	4℃保存	临用前加入 10mL 提取液充分溶解备用
试剂三	粉剂×1 支	4℃保存	用时每支加 1mL 双蒸水充分溶解备用
试剂四	粉剂×1 支	-20℃保存	用时每支加 500μL 双蒸水充分溶解备用
工作液：在 7.5mL 试剂二中加入 1mL 试剂三和 0.5mL 试剂四，可以根据比例现用现配			

产品说明：

ME 广泛存在于微生物、培养细胞、动物和植物胞浆中，尤其在植物组织中活性较高。ME 催化苹果酸氧化脱羧的可逆反应，产生丙酮酸和 CO_2，以及伴随 NAD(P)+的还原反应，是苹果酸代谢的关键酶。ME 活性与生物合成和抗氧化密切相关。近年来植物 ME 活性测定较多，已经成为抗氧化研究的热点。根据辅酶专一性和对底物特异性的不同，可将 ME 分为 NAD-ME(EC1.1.1.38)和NADP-ME(EC1.1.1.40)。

NADP-ME 催化 $NADP^+$还原成 NADPH，在 340nm 下测定 NADPH 增加速率。

试验中所需的仪器和试剂：

紫外分光光度计/酶标仪、低温离心机、水浴锅、可调节移液器、微量石英比色皿/96 孔（UV 板）、匀浆器和蒸馏水

操作步骤：

一、粗酶液提取：

细菌、细胞或组织样品的制备：

细菌或培养细胞：先收集细菌或细胞到离心管内，弃上清，按照每 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液，超声波破碎细菌或细胞（功率 20%，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次）。8000g 4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

组织：称取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液进行冰浴匀浆。8000g 4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

血清（浆）样品：直接检测

二、测定步骤：

1、紫外分光光度计/酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 340nm，蒸馏水调零。

2、将试剂一在 37℃（哺乳动物）或 25℃（其它物种）中保温 15min 左右。

3、操作表

试剂名称（μL）	测定管
试剂一	200
工作液	90
样本	10

将上述试剂按顺序加入微量石英比色皿/96 孔 UV 板中混匀，在 37℃（哺乳动物）或 25℃（其它物种），340 nm 波长下记录初始吸光度 A1 和反应 1min 后的吸光度 A2，计算ΔA=A2-A1。

注意事项：

1、若 A2-A1 大于 0.5，需将酶液用提取液稀释，使 A2-A1 小于 0.5，可提高检测灵敏度。

2、实验时，试剂三、试剂四和样本在冰上放置，以免变性和失活。试剂一 37℃或 25℃水浴放置。

3、比色皿中反应液的温度必须保持 37℃或 25℃，取小烧杯一只装入一定量的 37℃或 25℃蒸馏水，将此烧杯放入 37℃或 25℃水浴锅中。在反应过程中把比色皿连同反应液放在此烧杯中。用 96 孔板（UV板）做时尽量保持反应温度在 37℃或 25℃。

4、最好两个人同时做此实验，一个人比色，一个人计时，以保证实验结果的准确性。用 96 孔板（UV板）做时尽量做到样本反应时间一致。

5、如果ΔA＜0.01，可将反应时间延长 5 分钟或 10 分钟

三、NADP-ME 活性计算：

a.用微量石英比色皿测定的计算公式如下

1、 组织中 NADP-ME 活力的计算：

（1）按样本蛋白浓度计算：

单位的定义：每 mg 组织蛋白在反应体系中每分钟生成 1 nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

NADP-ME（U/mg prot）＝[ΔA×V 反总÷（ε×d）×10⁹]÷(Cpr×V 样）÷T=4823×ΔA÷Cpr

（2）按样本鲜重计算：

单位的定义：每 g 组织在反应体系中每分钟生成 1 nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

NADP-ME（U/g 鲜重）＝[ΔA×V 反总÷（ε×d）×10⁹]÷(V 样÷V 样总×W）÷T =4823×ΔA÷W

2、 细菌或细胞中 NADP-ME 活力的计算：

（1）按样本蛋白浓度计算：

单位的定义：每 mg 组织蛋白在反应体系中每分钟生成 1 nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

NADP-ME（U/mg prot）＝[ΔA×V 反总÷（ε×d）×10⁹]÷(Cpr×V 样）÷T=4823×ΔA÷Cpr

（2）按细菌或细胞数量计算：

单位的定义：每 1 万个细菌或细胞在反应体系中每分钟生成 1 nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

NADP-ME（U/10^4 cell）＝[ΔA×V 反总÷（ε×d）×10^9]÷(V 样÷V 样总×500) ÷T=9.65×ΔA

3、 血清（浆）中 NADP-ME 活力的计算：

单位的定义：每 mL 血清在反应体系中每分钟生成 1 nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

NADP-ME（U/mL）＝[ΔA×V 反总÷（ε×d）×10^9]÷V 样÷T =4823×ΔA

V 反总：反应体系总体积，3×10^{-4} L； ε：NADPH 摩尔消光系数，6.22×10^3 L/mol/cm；d：比色皿光径，1cm；V 样：加入样本体积，0.01 mL；V 样总：加入提取液体积，1 mL；T：反应时间，1min；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样品质量，g；500：细菌或细胞总数，500 万。

b.用 96 孔板（UV板）测定的计算公式：

将上述公式中的d-96 孔板光径改为 0.8cm 进行计算。